

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox. ✓

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Didier LEFEVRE et al.

Serial No.: To be assigned : Art Unit: To be assigned

Filed: Herewith : Examiner: To be assigned

For: REAGENT AND PROCESS FOR THE  
IDENTIFICATION AND COUNTING OF  
BIOLOGICAL CELLS : Atty Docket: 20198/0059

Jc971 U.S. PTO  
10/08/118  
02/25/02

**SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT(S) and**  
**CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

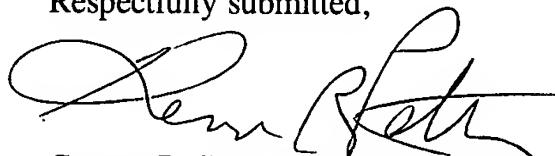
Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), certified copies of which are enclosed. The documents were filed in a foreign country within the proper statutory period prior to the filing of the above-referenced United States patent application.

<u>Priority Document Serial No.</u>	<u>Country</u>	<u>Filing Date</u>
0102489	France	February 23, 2001

Acknowledgement of this claim and submission in the next official communication is respectfully requested.

Respectfully submitted,



George R. Pettit, Reg. No. 27,369  
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP  
1990 M Street, N.W.  
Washington, D.C. 20036-3425  
Telephone: 202-331-7111

Date: 2/25/02

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



jc971 u.s. pro  
10/08/1118



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

21 JAN. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W /190600

<p>REMISE DES PIÈCES DATE <b>23 FEV 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b></p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0102489</b> DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>23 FEV. 2001</b></p> <p>Vos références pour ce dossier ( facultatif ) <b>ABX Aff 10 (120545)</b></p>		<p>Réervé à l'INPI</p> <p><b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p><b>CABINET NETTER</b> <b>40 rue Vignon</b> <b>75009 PARIS</b></p>
--	--	---

<p><b>Confirmation d'un dépôt par télecopie</b></p> <p><input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télecopie</p>		
<p><b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b></p> <p>Demande de brevet Demande de certificat d'utilité</p>		<p><b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>
<p>Demande divisionnaire</p> <p><i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i></p>		<p><input type="checkbox"/></p>
		<p>N° _____ Date _____ / _____ / _____</p>
		<p>N° _____ Date _____ / _____ / _____</p>
		<p><input type="checkbox"/> N° _____ Date _____ / _____ / _____</p>

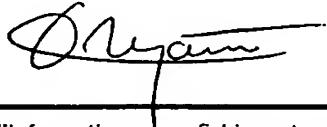
<p><b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p><b>Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques.</b></p>	
---	--

<p><b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b></p>		<p>Pays ou organisation Date _____ / _____ / _____ N° _____</p> <p>Pays ou organisation Date _____ / _____ / _____ N° _____</p> <p>Pays ou organisation Date _____ / _____ / _____ N° _____</p> <p><input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</b></p>
<p><b>5 DEMANDEUR</b></p> <p>Nom ou dénomination sociale <b>ABX</b></p> <p>Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Adresse _____ Rue _____ Code postal et ville <b>Parc Euromédecine - Rue du Caducée - BP 7290</b></p> <p>Pays Nationalité N° de téléphone ( facultatif ) N° de télecopie ( facultatif ) Adresse électronique ( facultatif )</p>		<p><input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</b></p> <p><b>Société Anonyme</b> _____ _____ <b>34184   MONTPELLIER Cedex 4</b> <b>France</b> <b>française</b></p>

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2**

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	23 FEV 2001	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0102489	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W /190600

<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>( facultatif )</i>		abx aff. 10 (120545)
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom <b>BEZAULT</b> Prénom <b>Jean</b> Cabinet ou Société <b>Cabinet NETTER</b>  N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel  Adresse <b>40 rue Vignon</b> Rue <b>75009</b> Code postal et ville <b>PARIS</b>  N° de téléphone <i>( facultatif )</i> <b>01 47 42 02 23</b> N° de télécopie <i>( facultatif )</i> <b>01 47 42 60 02</b> Adresse électronique <i>( facultatif )</i>		
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention <i>( joindre un avis de non-imposition )</i> <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt <i>( joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence )</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <i>( Nom et qualité du signataire )</i> <b>N° Conseil 92-1024 (B) (M)</b> <b>Jean BEZAULT</b> 		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 

ABX10.FR.D

Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques

5 L'invention se rapporte aux analyses biologiques et notamment aux analyses de sang.

10 Elle concerne plus particulièrement un réactif et un procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang.

15 L'échantillon biologique peut être du sang humain ou animal, ou encore tout autre liquide biologique ou préparation biologique.

20 Dans le domaine des analyses biologiques, l'importance du diagnostic de la détermination et du comptage précis de différentes populations cellulaires est reconnue depuis longtemps. En effet, l'apparition de rapports d'équilibre anormaux entre populations cellulaires normales du sang peut être corrélée à l'apparition de certaines maladies, par exemple réactions immunitaires, inflammatoires, etc. De même,

25 l'apparition de populations cellulaires anormales peut également être corrélée à l'apparition d'autres maladies, telles que des leucémies, etc.

30 Les méthodes traditionnelles d'analyse cytologique peuvent être variées, et comprennent l'observation microscopique après coloration, et éventuellement sémination ou agrégation. La détermination automatique des cellules sanguines a commencé dans le début des années 1960 par la séparation des principales populations leucocytaires normales ; voir la référence

35 bibliographique suivant : (1) Hallerman L., Thom R., Gerhartz H. : "Elektronische Differentialzählzung von Granulocyten und Lymphocyten nach intervaller Fluochromierung mit Acridinorange."

Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques

5 L'invention se rapporte aux analyses biologiques et notamment aux analyses de sang.

10 Elle concerne plus particulièrement un réactif et un procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang.

15 L'échantillon biologique peut être du sang humain ou animal, ou encore tout autre liquide biologique ou préparation biologique.

20 Dans le domaine des analyses biologiques, l'importance du diagnostic de la détermination et du comptage précis de différentes populations cellulaires est reconnue depuis longtemps. En effet, l'apparition de rapports d'équilibre anormaux entre populations cellulaires normales du sang peut être corrélée à l'apparition de certaines maladies, par exemple réactions immunitaires, inflammatoires, etc. De même, 25 l'apparition de populations cellulaires anormales peut également être corrélée à l'apparition d'autres maladies, telles que des leucémies, etc.

30 Les méthodes traditionnelles d'analyse cytologique peuvent être variées et comprennent l'observation microscopique après coloration, et éventuellement sédimentation ou agrégation. La détermination automatique des cellules sanguines a commencé dans le début des années 1960 par la séparation des principales populations leucocytaires normales ; voir la référence 35 bibliographique suivante : (1) Hallerman L., Thom R., Gerhardt H. : "Elektronische Differentialzählzung von Granulocyten und Lymphocyten nach intervaller Fluochromierung mit Acridinorange."

Verh Deutsch Ges Inn Med 70 : 217, 1964.

La séparation des leucocytes a été réalisée en cytométrie de flux par l'utilisation de multiples principes impliquant les propriétés optiques et chimiques des cellules. Plusieurs automates d'hématologie ont été fabriqués, utilisant des techniques variées, comme le principe de Coulter pour la détermination des volumes, la mesure de lumière diffractée pour l'estimation des tailles, la mesure de lumière diffusée à 90° pour la détermination des structures internes des cellules, et les mesures de fluorescence ou d'absorption pour la détermination des affinités cellulaires à divers colorants ; voir les références bibliographiques 2 à 5 suivantes :

(2) Adams L.R., Kamensky L.A. : "Fluorometric Characterization of Six Classes of Human Leukocytes." *Acta Cytol* 18 : 389, 1974;

(3) Shapiro H.M. et al. "Combined Blood Cell Counting and Classification with Fluorochrome Stains and Flow Instrumentation" *J. Histochem Cytochem* 24 : 396-411, 1976 ;

(4) Terstappen L.W. et al. "Multidimensional Flow Cytometric Blood Cell Differentiation Without Erythrocyte Lysis." *Blood Cells* 17: 585-602, 1991 ;

(5) Terstappen L.W., Levin J. "Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry" *Blood Cells* 18 (2) : 311-30, 1992.

25

La caractérisation de cellules à des stades précoce du cycle cellulaire a depuis longtemps intéressé les scientifiques et la quantification du contenu de chaque cellule en ARN est reconnue de longue date comme étant un paramètre représentatif de ce cycle ; voir les références bibliographiques 2 à 5 ci-dessus et les références bibliographiques 6 et 7 suivantes :

(6) Traganos F., Darzynkiewicz Z., Sharpless T., Melamed M.R. "Simultaneous Staining of Ribonucleic and Deoxyribonucleic Acids in Unfixed Cells Using Acridine Orange in a Flow Cytofluorometric System" *J. Histochem Cytochem* 25 : 46, 1977 ;

(7) Pollack A. et al. "Flow Cytometric Analysis of RNA Content

in Different Cell Populations Using Pyronin Y and Methyl Green" Cytometry, vol. 3, n° 1, pages 28-35, 1982.

5 Dans son brevet français n° 97 01090, du 31 janvier 1997, la demanderesse a décrit déjà une composition, et plus particulièrement un réactif de coloration, permettant ce type d'analyse.

10 Pour automatiser de telles techniques, il est nécessaire de résoudre préalablement de multiples problèmes comme, notamment, la réduction des temps et du coût de traitement des échantillons. Cette réduction peut être abordée de différentes manières, la plus évidente étant la réduction du nombre de canaux pour n'effectuer qu'une seule préparation cellulaire à 15 la fois. Ce type de technique a préalablement été décrit par Léon W. Terstappen (référence 4 ci-dessus), mais nécessite un temps de traitement et d'analyse important, notamment pour le comptage précis des cellules nucléées dont la quantité est couramment mille fois plus faible que les cellules 20 érythrocytaires.

25 Couramment, pour pallier cela, l'échantillon biologique est fréquemment séparé en au moins deux aliquotes, dont l'une est préparée à une certaine concentration permettant l'étude des cellules érythrocytaires et des plaquettes, et dont l'autre est préparée à une concentration plus forte pour l'analyse des cellules nucléées.

30 Ces techniques connues présentent différents inconvénients. Préalablement à l'analyse, le traitement de cette aliquote comprend fréquemment la destruction spécifique des cellules érythrocytaires pour faciliter la mesure des cellules restantes. Une telle méthode permet d'obtenir plus rapidement 35 les résultats des observations, mais est néanmoins freinée par les temps de réaction, de transfert et de coloration pour

obtenir la préparation souhaitée.

Le temps d'incubation d'une suspension cellulaire dans une solution réactive est notamment lié au temps nécessaire aux 5 principes actifs pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Dans le brevet français 9701090 déjà cité, la demanderesse a décrit des moyens pour accélérer cette pénétration grâce à l'utilisation d'un additif, notamment d'un additif du type ionophore, pour aider à la pénétration cellulaire.

10

Le temps de traitement est également fonction du nombre d'étapes successives que devra subir l'aliquote. La lyse et la coloration des cellules sont couramment réalisées en deux étapes successives, dans un ordre ou dans l'autre (voir le 15 brevet US 6 004 816).

Ces deux étapes de dilution impliquent un coût non négligeable en matériel, associé à un temps de traitement minimal important.

20

C'est en conséquence un but de l'invention de proposer un réactif pour l'identification et le comptage de cellules biologiques qui surmonte les inconvénients précités.

25

C'est en particulier un but de l'invention de procurer un tel réactif qui permet d'effectuer simultanément la lyse de certaines cellules, en particulier de cellules érythrocytaires, la fixation des cellules nucléées et la coloration du matériel intracellulaire.

30

C'est également un but de l'invention de procurer un tel réactif qui permet de réaliser ces opérations dans un temps restreint pour réduire de façon importante les coûts et les temps d'analyse, et le nombre de réactifs.

35

L'invention propose à cet effet un réactif pour

l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, lequel comprend :

5 - un agent de lyse cellulaire choisi parmi au moins un détergent en une concentration efficace pour lyser spécifiquement un type donné de cellules de l'échantillon, et

10 - un colorant propre à marquer les acides nucléiques intracellulaires des cellules restantes non lysées.

10 L'invention procure ainsi un réactif de lyse et de coloration simultanée d'un échantillon biologique, permettant d'obtenir en une seule étape une solution de cellules pouvant être analysée, par exemple par un système de cytométrie en flux. Cette analyse permet d'obtenir une classification et un comptage des cellules ainsi traitées.

20 Ainsi, le réactif de l'invention combine une solution réactive du type décrit dans le brevet français 97 01090 avec un agent de lyse cellulaire qui permet de lyser spécifiquement un type donné de cellules de l'échantillon, en particulier les cellules érythrocytaires.

25 La solution réactive colorante en elle-même, décrite dans le brevet français 97 01090, permet d'accélérer la perméation membranaire pour la coloration des cellules biologiques de l'échantillon. Cette solution colorante peut être utilisée aussi bien avant qu'après la lyse des hématies selon les types cellulaires à étudier. Ainsi, le principe réactif de cette 30 solution colorante a été conservé et transposé au sein d'une solution lytique permettant une destruction des hématies et une coloration des cellules restantes préalablement à la mesure.

35 L'agent de lyse cellulaire comprend avantageusement au moins un détergent ionique et/ou non ionique dans une concentration propre à lyser les érythrocytes.

Le détergent de l'invention est avantageusement choisi parmi :

- 5 - les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines, les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;
- 10 - les amides de diamines substituées, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide, les amides de diéthylènetriamine cyclisés,
- 15 - les alkylaryl sulfonates, sulfonates de pétrole, glycérides sulfonés ;
- les cholamides, les sulfobétaïnes ;
- les alkyl glycosides, les saponines ;
- 20 - les polyoxyéthylène éthers et sorbitans, et les polyglycol éthers.

Dans un exemple de réalisation, ce détergent comprend un mélange de Triton X100 à une concentration de 0,05% (p/v) et de Tween 20 à une concentration de 0,0001% (v/v).

Dans toute la description, l'expression "p/v" signifie "poids/volume" et l'expression "v/v" signifie "volume/volume".

30 Le colorant utilisé est avantageusement du type fluorescent.

Avantageusement, on choisit un colorant qui est propre à s'associer spécifiquement à l'acide ribonucléique intracellulaire et à augmenter sa fluorescence, une fois 35 associé à celui-ci.

Le colorant de l'invention peut être choisi notamment parmi la les colorants suivants :

- le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-5benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate,
- le thiazole blue,
- le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-10benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonium)propyl], diodure,
- le 3,3'-diméthyloxacarbocyanine iodure ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2-(3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure,
- la thioflavine T,
- les colorants SYTO® et TOTO® (TM Molecular Probes),
- le bromure d'éthidium,
- l'iodure de propidium,
- 25 - l'acridine orange,
- la coriphosphine O,
- l'auramine O,
- 30 - les colorants HOECHST 33258 et HOECHST 33342,
- le 4',6-diamino-2-phénylindole, dihydrichlorure (DAPI),
- 35 - le 4',6-(diimidazolin-2-yl)-2-phénylindole, dihydrochlorure (DIPI),

- la 7 aminoactinomycine D,
- l'actinomycine D, et
- 5 - le LDS 751.

Dans une forme de réalisation préférée de l'invention, le réactif comprend en outre au moins un agent de pénétration membranaire propre à favoriser la pénétration du colorant dans 10 les cellules à marquer.

L'agent favorisant la pénétration membranaire est avantageusement un composé ionophore de type protonophore et/ou 15 antibiotique.

Cet agent est généralement présent à une concentration inférieure à 0,005% (p/v). Un exemple d'antibiotique utilisable est la valinomycine.

20 Il est avantageux que le réactif comprenne, en outre, au moins un agent de fixation membranaire présent à une concentration de 0,1% à 10% (p/v). Cet agent de fixation comprend, de préférence, au moins un alcool et/ou un aldéhyde. A ce titre, 25 on préfère utiliser, par exemple, le paraformaldéhyde ou le glutaraldéhyde.

Il entre également dans le cadre de l'invention de prévoir d'autres additifs ou composants dans le réactif.

30 Ainsi, ce réactif peut comprendre, en outre, au moins un composé choisi parmi un agent complexant, un sel inorganique et un système tampon.

35 Sous un autre aspect, l'invention concerne un procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un

échantillon, en particulier dans un échantillon de sang, lequel comprend les opérations suivantes :

- mélanger et incuber l'échantillon avec un réactif tel que défini ci-dessus pour réaliser, en une seule étape, la lyse de cellules d'un type donné, en particulier de cellules érythrocytaires, la coloration des acides nucléiques intracellulaires et la fixation des cellules nucléées ;
- 10 - mesurer la solution résultante en cytométrie de flux avec au moins deux paramètres de mesure choisis parmi le volume résistif, la diffraction lumineuse dans l'axe, la transmission lumineuse dans l'axe, la diffusion lumineuse orthogonale et la fluorescence ; et
- 15 - classifier et compter les cellules nucléées en populations, au moyens des paramètres mesurés.

Dans la mesure en cytométrie de flux, le paramètre de diffraction lumineuse dans l'axe est au moins un paramètre choisi parmi la diffraction aux petits angles et la diffraction aux grands angles.

Cette mesure peut être réalisée au moyen d'un cytomètre de flux possédant les paramètres conventionnels tels que la diffraction dans l'axe ou "FSC" (Forward Scatter), la diffusion orthogonale ou "SSC" (Side Scatter), la fluorescence soit orthogonale (FL1), soit dans l'axe, soit en épi-fluorescence, le tout polarisé ou dépolarisé, mais également des paramètres de mesure additionnels tels que la mesure de lumière transmise ou la volumétrie résistive, telles que décrites dans le brevet français 89 14120 du 27 octobre 1989.

La résistivité peut être mesurée au moyen d'un courant continu (DC) afin d'exprimer le volume des éléments et/ou au moyen d'un courant pulsé ou alternatif (RF) afin d'exprimer les

différences densimétriques internes s'approchant de la détermination de la structure.

De ces paramètres, peuvent être extraits des ensembles 5 d'informations multiparamétriques pour chacune des cellules analysées, permettant leur classification. La classification sera d'autant plus précise que les paramètres définissant les cellules seront pertinents et nombreux. Ce type d'étude multiparamétrique a déjà été décrit précédemment (voir les 10 références bibliographiques 4 et 5 ci-dessus).

Dans le cadre de l'invention, les cellules nucléées classifiées 15 sont indifféremment des cellules matures ou immatures, normales ou anormales.

La classification des cellules nucléées est effectuée par des procédés connus. Elle peut être réalisée par un logiciel 20 d'analyse multidimensionnel avec ou sans le recours à une technique neuronale logicielle ou non.

Dans le cadre de l'invention, l'échantillon biologique peut 25 être un échantillon de sang humain ou animal, ou encore un échantillon de liquide biologique ou une suspension de cellules, d'origine humaine ou animale.

Cet échantillon est mélangé avec la solution réactive dans des conditions de température définies. La cinétique de réaction fait que les cellules érythrocytaires sont d'abord détruites, 30 la pénétration du colorant est aidée parallèlement à la fixation des cellules qui se fait plus lentement.

L'invention sera décrite maintenant en référence à l'exemple suivant :

Exemple

Dans le cadre de cet exemple, on utilise un réactif ayant la composition suivante :

5

Agent complexant	EDTA	0,02 %	(p/v)
Sel inorganique	NaCl	0,85 %	(p/v)
Système tampon	Phosphates	0,5 %	(p/v)
10 Détergents	Triton X100	0,05 %	(p/v)
	Tween 20	0,0001 %	(v/v)
Ionophore	Valinomycine	0,003 %	(p/v)
Colorant	Thiazole orange	0,005 %	(p/v)
Aldéhyde	Paraformaldéhyde	1 %	(p/v)

15

Un échantillon de sang total est mélangé à la solution réactive ci-dessus. Après une incubation de quelques secondes (typiquement de l'ordre de 15 à 30 secondes), la solution est analysée au moyen d'un ensemble de cytométrie de flux comprenant au moins les paramètres suivants : diffraction dans l'axe (FSC) donnant une interprétation de la taille, diffusion orthogonale (SSC) exprimant la structure des éléments observés et fluorescence orthogonale (FL1) permettant de mesurer l'expression de l'acide ribonucléique intracellulaire.

20

Les résultats ainsi obtenus sont observés en mode multidimensionnel, afin de déterminer les inter-relations des différentes populations entre chaque paramètre.

25

30 On se réfère maintenant aux Figures 1 à 4 qui représentent les résultats obtenus avec un échantillon de sang humain normal.

La Figure 1 représente la matrice obtenue au moyen des deux paramètres de diffraction dans l'axe (FSC) et de diffusion

orthogonale (SSC). Quatre populations se détachent nettement : L figurant les lymphocytes, M figurant les monocytes, N figurant les polynucléaires neutrophiles et E figurant les polynucléaires éosinophiles. Les populations IG pour immature 5 granuleux, BL pour blastes, B pour polynucléaires basophiles et ErB pour érythroblastes sont indiquées mais non dissociables en seulement deux dimensions.

La Figure 2 représente la matrice formée par les paramètres de 10 diffraction dans l'axe (FSC) et de fluorescence (FL1). Les quatre mêmes populations que représenté à la Figure 1 se retrouvent, mais organisées différemment. Les cellules mononucléées L et M forment le groupe supérieur de fluorescence moyenne et les cellules polymorphonucléées N, E et B forment le 15 groupe inférieur de fluorescence faible. La population ErB des érythroblastes est nettement séparée à la pointe des deux groupes ainsi formés. Les emplacements normaux des populations BL et IG sont indiqués.

20 La Figure 3 représente la matrice formée par les paramètres de diffusion orthogonale (SSC) et de fluorescence (FL1). Les mêmes populations se retrouvent organisées d'une manière différente mais permettant d'isoler les populations IG et BL (en très petites quantités dans un échantillon normal).

25

La Figure 4 représente une vision tridimensionnelle des populations obtenues.

Les Figures 5 à 8 représentent les mêmes types de résultats que 30 les Figures 1 à 4 respectivement, mais obtenus avec un échantillon présentant des cellules blastiques (Bl) et traité conformément à l'invention.

Les Figures 9 à 12 représentent les mêmes types de résultats 35 que les Figures 1 à 4 respectivement, mais obtenus avec un échantillon présentant des cellules granulocytaires immatures

(IG) et traité conformément à l'invention.

Le réactif et le procédé de l'invention permettent ainsi, en une seule étape, de réaliser une lyse spécifique et une 5 coloration simultanée de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang humain ou animal.

On peut ainsi obtenir rapidement une identification et un 10 comptage de cellules à partir d'un automate d'analyse basé sur la cytométrie de flux.

Revendications

1. Réactif pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un agent de lyse cellulaire choisi au moins undétergent en une concentration efficace pour lyser spécifiquement un type donné de cellules de l'échantillon, et

10

- un colorant propre à marquer les acides nucléiques intracellulaires des cellules restantes non lysées.

15

2. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent de lyse cellulaire comprend au moins un détergent ionique et/ou non ionique dans une concentration propre à lyser les érythrocytes.

20

3. Réactif selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi :

- les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines, les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;

25

- les amides de diamines substituées, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide, les amides de diéthylènetriamine cyclisés,

30

- les alkylaryl sulfonates, sulfonates de pétrole, glycérides sulfonés ;

- les cholamides, les sulfobétaïnes ;

35

- les alkyl glycosides, les saponines ;

- les polyoxyéthylène éthers et sorbitans, et les polyglycol éthers.

4. Réactif selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé  
5 en ce que le colorant est du type fluorescent.

5. Réactif selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé  
en ce que le colorant est propre à s'associer spécifiquement à  
10 l'acide ribonucléique intracellulaire et à augmenter sa  
fluorescence, une fois associé à celui-ci.

6. Réactif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé  
en ce que le colorant est choisi parmi :

15 - le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-  
benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate,

- le thiazole blue,

20 - le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-  
benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonium)propyl], diodure,

25 - le 3,3'-diméthyloxacarbocyanine iodure ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2-(3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure,

- la thioflavine T,

30 - les colorants SYTO® et TOTO® (TM Molecular Probes),

- le bromure d'éthidium,

- l'iodure de propidium,

35

- l'acridine orange,

- la coriphosphine O,
- l'auramine O,
- 5 - les colorants HOECHST 33258 et HOECHST 33342,
- le 4',6-diamino-2-phénylindole, dihydrichlorure (DAPI),
- 10 - le 4',6-(diimidazolin-2-yl)-2-phénylindole, dihydrochlorure (DIP),
- la 7 aminoactinomycine D,
- 15 - l'actinomycine D, et
- le LDS 751.

7. Réactif selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un agent de pénétration membranaire propre à favoriser la pénétration du colorant dans les cellules à marquer.

8. Réactif selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'agent favorisant la pénétration membranaire est un composé 25 ionophore de type protonophore et/ou antibiotique.

9. Réactif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un agent de fixation membranaire présent à une concentration de 0,1% à 10% (p/v).

30 10. Réactif selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'agent de fixation membranaire comprend au moins un alcool et/ou un aldéhyde choisi parmi le paraformaldéhyde et le glutaraldéhyde.

35 11. Réactif selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé

en ce qu'il comprend en outre au moins un composé choisi parmi un agent complexant, un sel inorganique et un système tampon.

5 12. Procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang, caractérisé en ce qu'il comprend les opérations suivantes :

10 - mélanger et incuber l'échantillon avec un réactif selon l'une des revendications 1 à 11 pour réaliser, en une seule étape, la lyse de cellules d'un type donné, en particulier de cellules érythrocytaires, la coloration des acides nucléiques intracellulaires et la fixation des cellules nucléées ;

15 15 - mesurer la solution résultante en cytométrie de flux avec au moins deux paramètres de mesure choisis parmi le volume résistif, la diffraction lumineuse dans l'axe, la transmission lumineuse dans l'axe, la diffusion lumineuse orthogonale et la fluorescence ; et

20 20 - classifier et compter les cellules nucléées en populations, au moyens des paramètres mesurés.

25 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la mesure de résistivité est effectuée au moyen d'au moins un courant choisi parmi un courant continu (DC) et un courant pulsé ou alternatif (RF).

30 14. Procédé selon l'une des revendications 12 et 13, caractérisé en ce que le paramètre de diffraction lumineuse dans l'axe est au moins un paramètre choisi parmi la diffraction aux petits angles et la diffraction aux grands angles.

35 15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que les cellules nucléées classifiées sont

indifféremment des cellules matures ou immatures, normales ou anormales.

16. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15,  
5 caractérisé en ce que la classification des cellules nucléées est réalisée par un logiciel d'analyse multidimensionnel avec ou sans le recours à une technique neuronale logicielle ou non.

17. Procédé selon l'une des revendications 12 à 16,  
10 caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sang humain ou animal.

18. Procédé selon l'une des revendications 12 à 16,  
caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de  
15 liquide biologique ou une suspension de cellules, d'origine humaine ou animale.

FIG. 1

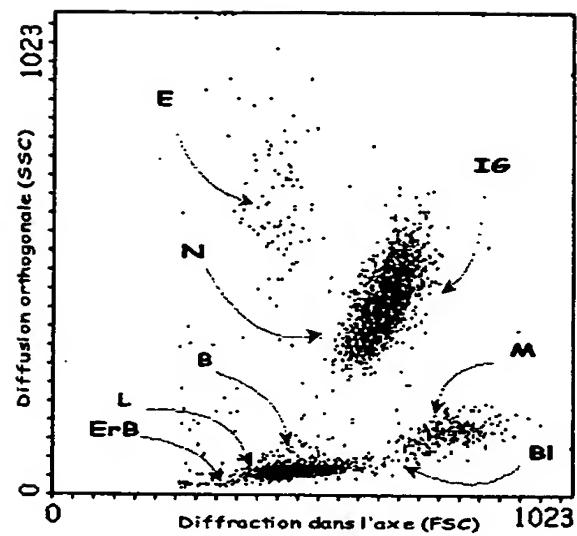


FIG. 2

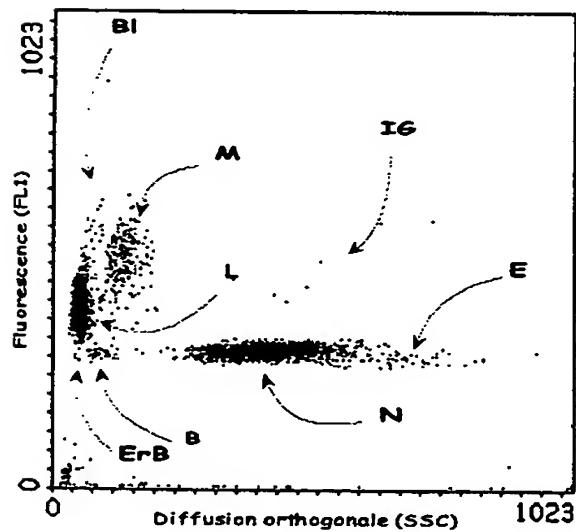
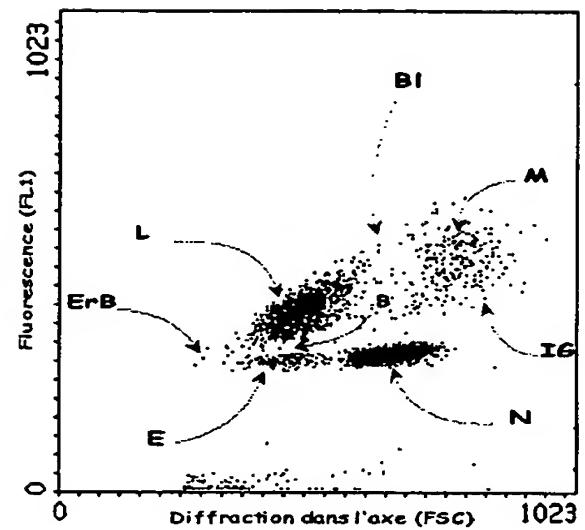


FIG. 3

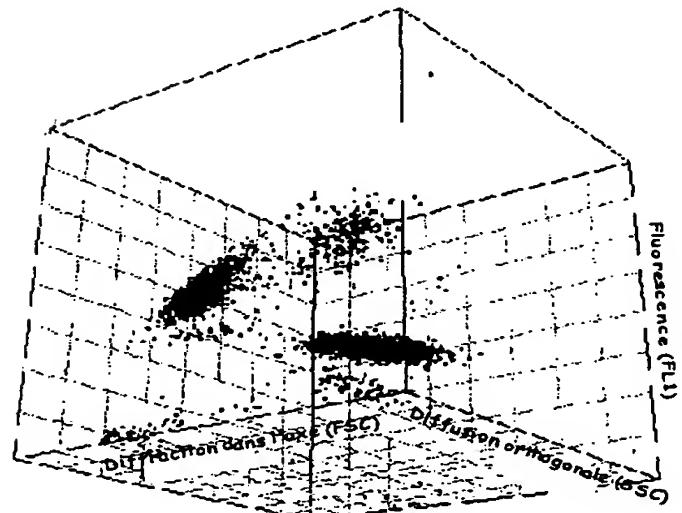


FIG. 4

FIG. 5

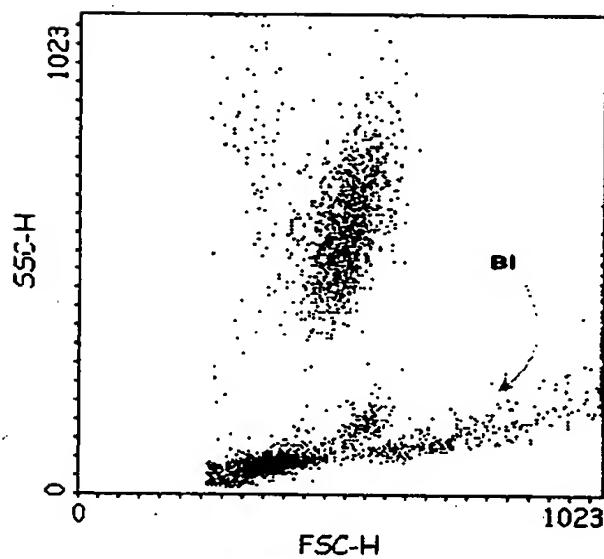


FIG. 6

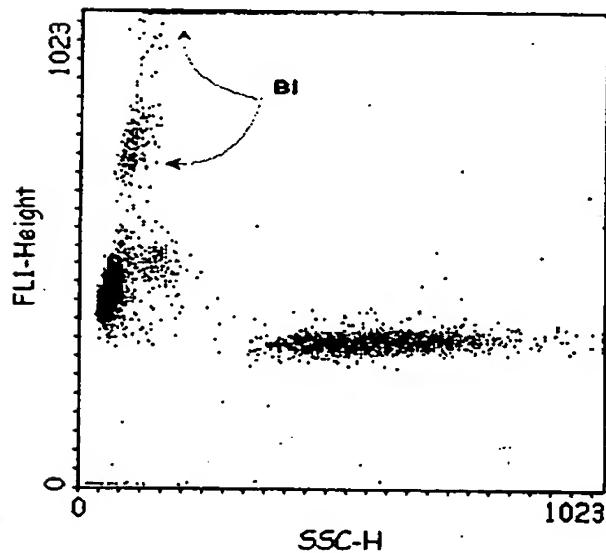
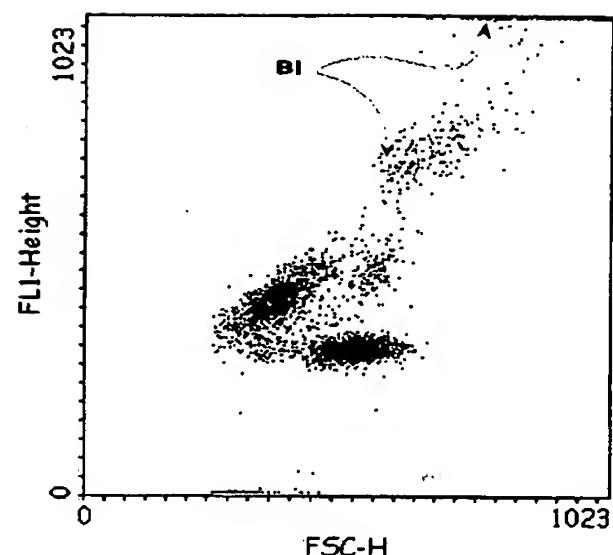


FIG. 7

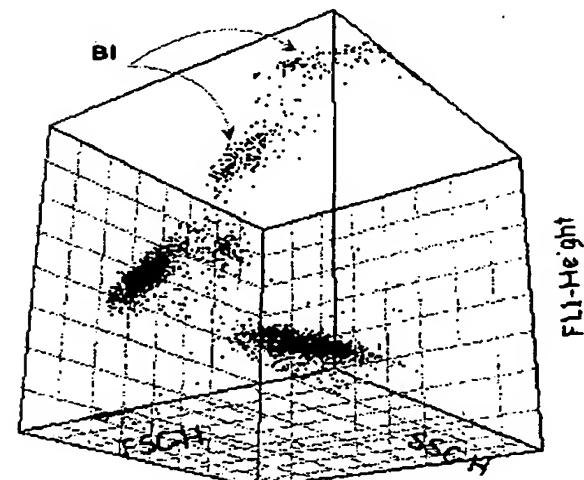


FIG. 8

FIG. 9

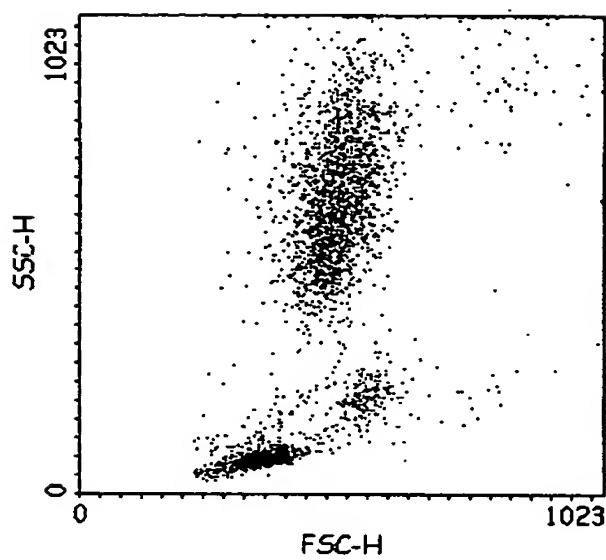


FIG. 10

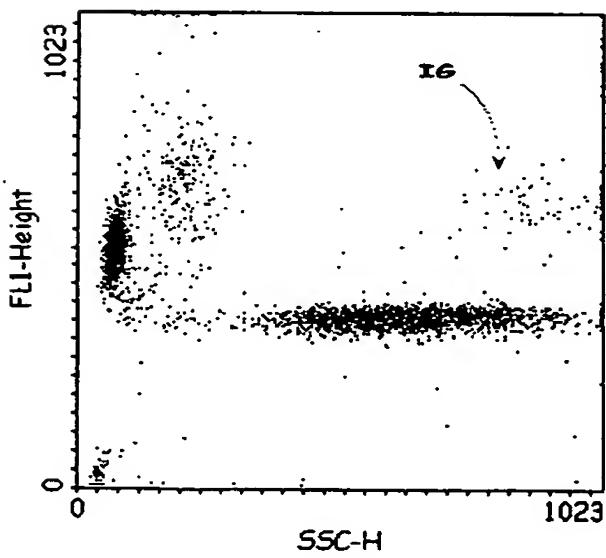
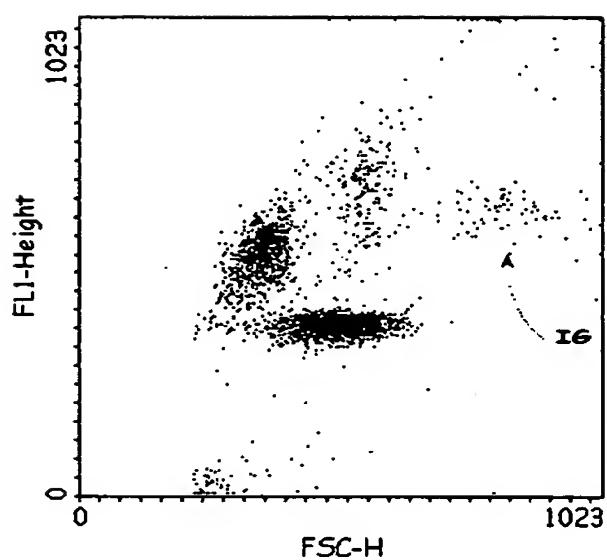


FIG. 11

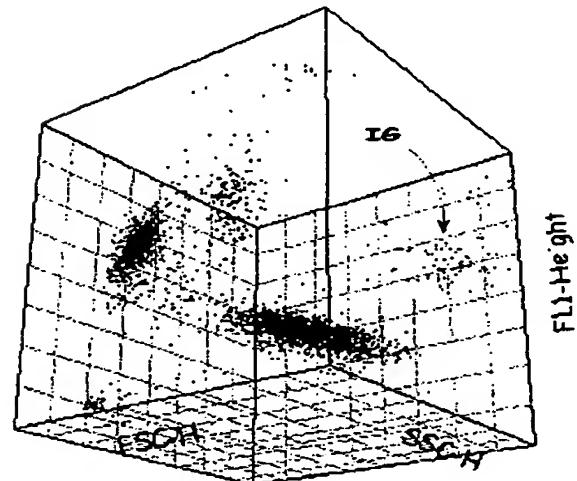


FIG. 12

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

 26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
 75800 Paris Cedex 08  
 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / .1.**

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>	<b>ABX Aff. 10 (120545)</b>		
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>	<i>0102689</i>		
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>			
<b>Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques.</b>			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
<b>ABX</b>			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).</b>			
<b>Nom</b>		<b>LEFEVRE</b>	
<b>Prénoms</b>		<b>Didier</b>	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	<b>160 rue du Mazet</b>	
	<b>Code postal et ville</b>	<b>34980</b>	<b>SAINT CLEMENT DE RIVIERE</b>
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		<b>VERIAC</b>	
<b>Prénoms</b>		<b>Sylvie</b>	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	<b>Les Jardins de l'Alhambra N° 7 511, rue Mr Teste</b>	
	<b>Code postal et ville</b>	<b>34000</b>	<b>MONTPELLIER</b>
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		<b>CHAMPSEIX</b>	
<b>Prénoms</b>		<b>Henri</b>	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	<b>2 chemin de Cambas Pioch de Baillos</b>	
	<b>Code postal et ville</b>	<b>34980</b>	<b>MONTFERRIER SUR LEZ</b>
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>Paris, le 23 février 2001 N° Conseil 92-1024 (B) (M) Jean BEZAULT</b>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**